

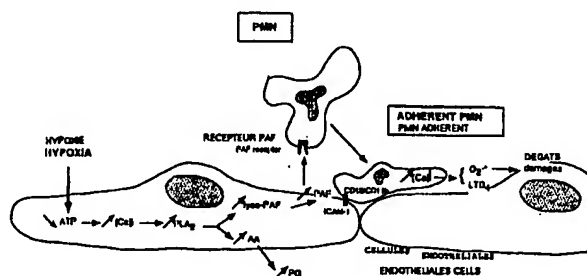


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 31/12, 31/185, 31/37, 31/70, 35/78	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/51291 (43) Date de publication internationale: 19 novembre 1998 (19.11.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00067 (22) Date de dépôt international: 12 mai 1998 (12.05.98) (30) Données relatives à la priorité: 9700415 13 mai 1997 (13.05.97) BE (71)(72) Déposant et inventeur: REMACLE, José [BE/BE]; Chemin des Pierres 14, B-5020 Malonne (BE). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): MICHIELS, Carine [BE/BE]; Rue de la Christree, B-5190 Spy (BE). (74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, DE (modèle d'utilité), EE, GE, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: USE OF A PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING AND/OR PREVENTING ISCHEMIA

(54) Titre: UTILISATION D'UNE COMPOSITION PHARMACEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT ET/OU LA PREVENTION DE L'ISCHEMIE



(57) Abstract

The invention concerns the use of a pharmaceutical composition comprising a suitable pharmaceutical carrier and an active compound selected among the group consisting of bioflavonoids, rutin-garlic, troxerutin, coumarin, diosmin, o-(hydroxyethyl) rutins, sweet clover and rutin extracts, tribenoside, methylchalcone hesperidin, Indian chestnut extract, naphthazone, esculoside, aescin, procyanidine oligomers, butcher's broom and methylchalcone hesperidine extracts, ruscoides, common holly and black currant extracts, blueberry anthocyanin extracts, the active principles of these compounds and/or a mixture of them, acting on a patient's mitochondrial membrane protein complexes, to prepare a medicine for treating and/or preventing ischemia and/or pathologies associated with ischemia or with energy deficiency.

(57) Abrégé

La présente invention concerne l'utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique adéquat et un composé actif choisi parmi le groupe constitué par les citroflavonoïdes, l'ail-rutoside, la troxérutine, la coumarine, la diosmine, les o-(hydroxyéthyl) rutosides, les extraits de Mélilot et de rutoside, le tribénoside, l'héspéridine méthylchalcone, l'extrait de marron d'Inde, le naftazone, l'esculoside, l'aescine, les oligomères procyanidoliques, les extraits de ruscus et d'héspéridine méthylchalcone, les ruscosides, les extraits de petit houx et cassis, les extraits d'anthocyanodisiques de myrtilles, les principes actifs de ces composés et/ou mélange d'entre eux, agissant sur les complexes protéiniques de la membrane mitochondriale interne d'un patient, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention de l'ischémie et/ou des pathologies associées à l'ischémie ou à un déficit énergétique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

5

UTILISATION D'UNE COMPOSITION PHARMACEUTIQUE DANS LE
TRAITEMENT ET/OU LA PREVENTION DE L'ISCHEMIE

10

Objet de l'invention

La présente invention est relative à l'application thérapeutique et/ou prophylactique d'une composition pharmaceutique dans le traitement et/ou la
15 prévention de l'ischémie et de pathologies associées à l'ischémie.

Etat de la technique et arrière-plan technologique

Pour traiter certaines maladies variqueuses,
20 il a été proposé différents composés actifs, dont la plupart sont présents dans des extraits de plantes. De tels composés sont notamment décrits dans les documents suivants : demande de brevet français FR-2692145, demande de brevet français FR-2668705, brevet européen EP-0541874-
25 B1, demande internationale de brevet WO93/20046, demande internationale de brevet WO93/20045, brevet européen EP-0566445-B1, demande de brevet européen EP-0210781-A1 et demande de brevet européen EP-0112770-A1.

De même, des composés actifs isolés à partir
30 d'extraits de plantes ont été utilisés pour le traitement des conséquences de l'ischémie ou des pathologies associées à l'ischémie. C'est le cas des flavonoïdes qui sont connus

comme étant des antioxydants et qui peuvent limiter les dégâts provoqués par les radicaux libres produits lors de la reperfusion. En effet, lors de la reperfusion après une période d'ischémie, une production très importante de radicaux libres dérivés de l'oxygène est observée qui va provoquer des dégâts aux divers constituants de la cellule affaiblie par la période d'ischémie notamment par le manque d'énergie (ATP). Cette production accrue de radicaux libres a été bien mise en évidence par Mc Cord J.M. (1985, N. Engl. J. Med., 312: 159-163). Elle est due à l'activation de la xanthine oxydase pendant la période d'ischémie et à sa très grande activité lors de la reperfusion. Ainsi les molécules anti-oxydantes comme les flavonoïdes ont un effet bénéfique sur le processus d'ischémie reperfusion puisqu'elles protègent le tissu contre cet excès de radicaux libres (Reddy D.S. et al., 1995, Drugs of today, 31: 335-349).

Cependant, de nombreux extraits de plantes sont constitués de mélange de nombreuses macromolécules complexes, et la présence sur certaines d'entre elles de structures de type flavonoïde connues pour leurs propriétés anti-oxydantes a occulté la possibilité pour ces extraits ou ces molécules d'une éventuelle présence d'une activité anti-ischémique propre, c'est-à-dire indépendante du processus de réoxygénation.

L'activité des flavonoïdes sur l'ischémie et la diminution de l'impact du myocarde est due à cette activité de contrôle des dérivés actifs de l'oxygène (Reddy et al., 1995, Drugs of today, 31: 335-349; DE-3623255, OXO Chimie GMBH, 1988). La Troxérutine a notamment été utilisée comme molécule anti-oxydante permettant de protéger le coeur pendant le processus d'ischémie reperfusion (Blasug

I.E. et al., 1987, Biomed. Biochim. Acta, vol. 46: 5539-544; XP 002052079 et Olszenski A.J., 1991, Atherosclerosis, 88: 97-98).

De même la diosmine bloquant la formation de
5 radicaux libres par la Xanthine oxydase (qui se produisent lors de la reperfusion après l'ischémie) a été utilisée dans ce sens comme pouvant protéger durant l'ischémie (Bouskela E. et al., 1997, 48: 33-37; Int. J. Microcirc. Clin. Exp., 1995, 15: 293-300; Debbarre B. et al., 1995,
10 Int. J. Microcirc. Clin. Exp., 15 suppl. I: 27-33).

Les rutosides ont aussi été testés pour leur activité anti-ischémique avec succès. C'est ainsi qu'il réduisent la taille de l'impact dans des animaux sujets à une occlusion artérielle (Zalewski A. et al., Am. J.
15 Cardiol., 1985, 56: 974-977), et soulagent également les patients avec une ischémie des membres inférieurs (Milliken J.C., Vasa, 1974, 3: 203-206).

La Naftoquinone, qui est connue pour son activité anti-aggrégante des plaquettes, peut être utilisée
20 pour inhiber la formation du Thrombus lors des thromboses (EP-A-0631777).

La mise en évidence de cette activité ne constitue pas une activité anti-ischémique en tant que telle mais une action sur une des causes de la thrombose à
25 savoir l'agrégation des plaquettes.

Buts de l'invention

La présente invention vise à fournir un nouveau procédé thérapeutique et/ou prophylactique de
30 l'ischémie et/ou des pathologies associées à l'ischémie.

Un but particulier de la présente invention vise à obtenir un procédé utilisant des agents

thérapeutiques non ou peu toxiques, présentant peu ou pas d'effets secondaires, et dont la synthèse ou l'extraction à partir de produits vivants, en particulier à partir de plantes, soit simple et peu coûteuse.

5

Éléments caractéristiques de l'invention

La présente invention concerne l'utilisation d'une composition pharmaceutique, comprenant un véhicule pharmaceutique et une quantité suffisante d'un composé

10 actif choisi parmi le groupe constitué par les citroflavonoïdes, l'ail-rutoside, la troxérutine, la coumarine, la diosmine, les o-(-hydroxyéthyl) rutosides, les extraits de Mélilot et de rutoside, le tribénoside, l'hespéridine méthylchalcone, l'extrait de marron d'Inde,

15 le naftazone, l'esculoside, l'aescine, les oligomères procyanidoliques, les extraits de ruscus et d'hespéridine méthylchalcone, les ruscosides, les extraits de petit houx et cassis, les extraits d'anthocyanodisiques de myrtilles, les principes actifs isolés de ces composés et/ou un

20 mélange d'entre eux, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention de l'ischémie et/ou des pathologies associées à l'ischémie.

Les composés actifs mentionnés ci-dessus sont des produits généralement isolés de plantes et/ou des

25 extraits de plantes, commercialisés par différentes firmes pharmaceutiques sous différentes marques. Ces différents composés actifs, identifiés par leur marque et les sociétés qui les commercialisent, sont repris dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Composés actifs de la composition selon l'invention

Principe actif	Marque ®	Société
Citroflavonoïdes	Agruton C	Sanofi-Winthrop
Citroflavonoïdes	Daflon	Eutherapie-Servier
Ail-Rutoside	Ex-Ail	Solvay
Tribénoside	Glyvenol	Ciba-Geigy
Hespéridine méthylchalcone	Hemocoavit	Wynlit/BioTherabel
Marron d'Inde	Intrait de Marron d'Inde	Pharmethic
Esculoside	Mictasol-P	Medgenix
Aescine	Reparil	Madaus
Oligomères procyanidoliques	Endothelon	Sanofi
Extraits de ruscus et hespéridine méthylchalcone	Cyclo 3	Fabre
Ruscosides	Cirkan	Sinbio-Fabre
Extraits de petit houx et cassis	Veinobiase	Laboratoire Fournier Schwartz- Pharma
Extraits d'anthocyanodisiques de myrtilles	Difrarel	Labo Leurquin Mediolanum

Le tableau 2 reprend les composés actifs de
5 la composition selon l'invention, qui ont déjà été montrés
comme pouvant protéger dans le processus d'ischémie
reperfusion.

Tableau 2 : Composés actifs de la composition selon l'invention, qui ont déjà été montrés comme pouvant protéger dans le processus d'ischémie reperfusion

Principe actif	Marque ®	Société
Troxérutine	Veinamitol	Vitalpharma
Coumarine Troxérutine	Venalot-Depot	Boots
Disomine	Ven Dretex	Therabel
o-(-hydroxyéthyl) rutosides	Venox	Eumedis/Therabel
Diosmine	Daflon	Servier
Extraits de mélilot et de rutosides	Esbérivène	Knoll
Troxérutine	Réoflux	Negma
Diosmine	Dioveinor	Imnothéra

5

De tels composés actifs ainsi que leur posologie et leur forme d'administration préférée, sont décrits également dans les documents "Répertoire commenté des médicaments" (Centre Belge d'Information Pharmaco-
 10 Thérapeutique, Bruxelles, 1994) et Vidal 1997 (éd. Du Vidal, 33 Av. de Wagram, Paris, France).

On entend par "principe actif isolé d'un composé actif de l'invention", la partie active ayant un effet thérapeutique et/ou prophylactique vis-à-vis de sa
 15 cible biochimique telle que décrite ci-dessous, et susceptible d'avoir des propriétés comparables et/ou améliorées dans le domaine thérapeutique et/ou prophylactique à celles du composé actif décrit ci-dessous.

Les principes et composés actifs de l'invention sont également caractérisés par un "effet protecteur" sur les complexes protéiniques de la membrane mitochondriale interne, c'est-à-dire que les principes et composés actifs de l'invention sont capables d'augmenter le RCR (Respiratory Control Ratio), qui représente le contrôle respiratoire mitochondrial, d'un patient. Le RCR représente le rapport entre la consommation d'oxygène en présence de substrats endogènes (glutamate / malate) et la consommation après phosphorylation de l'ADP en ATP, tel qu'il sera illustré ci-dessous.

Par ce mécanisme d'action, les produits de l'invention permettent de protéger le patient de l'ischémie ou des conséquences de l'ischémie. Les composés et principes actifs de l'invention sont donc caractérisés à la fois par un effet prophylactique et/ou thérapeutique.

De préférence, les produits de l'invention ont un effet protecteur sur le complexe I ou III de la chaîne de transport d'électrons des mitochondries, et/ou sur le complexe protéinique adénine translocase tel qu'illustré ci-dessous.

Les composés actifs préférés de l'invention sont l'hespéridine méthylchalcone, l'aescine, les oligomères procyanidoliques et les extraits d'anthocyanodisiques de myrtille, qui sont caractérisés par des propriétés particulièrement avantageuses et inattendues dans le traitement de l'ischémie, des pathologies associées à l'ischémie, à un déficit énergétique et aux déficiences liées au vieillissement.

On entend par "quantité suffisante d'un principe ou composé actif", une quantité suffisante de ce principe ou de ce composé actif pour traiter, soulager,

dissiper ou atténuer les symptômes ou les dysfonctionnements du corps humain ou animal associés aux maladies susmentionnées et/ou pour prévenir ou diminuer la possibilité d'en être atteint. Par conséquent,
5 l'application du traitement thérapeutique susmentionné est relative à un traitement prophylactique ou un traitement curatif desdites maladies. Le pourcentage de ce composé actif peut varier selon de très larges gammes, uniquement limitées par la tolérance et le niveau d'acceptation du
10 composé par le patient. Ces limites sont en particulier déterminées par la fréquence d'administration.

De préférence, les dosages sont les doses généralement utilisés de ces produits dans le traitement des maladies variqueuses, tels que décrits dans le document
15 "Répertoire commenté des médicaments, Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique, Bruxelles (1994)" et dans le document "Médicaments utilisés pour le traitement symptomatique des affections veineuses périphériques, Annexe des folia pharmacotherapeutica, Ministère Belge de
20 la Santé Publique et de l'Environnement, Commission de Transparence (juin 1994)". A titre d'exemple, le produit aescine vendu sous la marque Reparil ® est présenté sous forme de dragées d'un dosage de composé actif de 20 mg dans une composition galénique de 100 mg.

25 Le véhicule pharmaceutique utilisé varie selon le mode d'administration choisi (intraveineux, intramusculaire, oral, etc.) et peut comporter différentes formes telles que des tablettes, enrobées ou non enrobées, des pilules, des capsules, des solutions, des sirops, etc.

30 Les compositions pharmaceutiques seront préparées selon des procédés généralement utilisés par les galéniciens et les pharmaciens, et peuvent comprendre tout

type de véhicule pharmaceutique adéquat, solide, liquide et/ou gazeux (y compris de l'eau), non ou peu toxiques.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut également comporter un adjuvant ou un
5 autre composé pharmaceutique connu de l'homme du métier pour ses effets thérapeutiques et/ou prophylactiques sur les maladies susmentionnées ou pour ses propriétés susceptibles de diminuer les effets secondaires associés au composé actif présent dans la composition pharmaceutique de
10 l'invention.

De plus, la biodisponibilité des composés actifs de l'invention au niveau de l'organisme, notamment du fait de leur possible résorption et de leur passage dans des tissus cibles à protéger, peut être améliorée par des
15 techniques de conditionnement et d'enrobage et/ou de "drug targetting" bien connues de l'homme de l'art.

On entend par "ischémie (partielle ou totale) ou pathologies associées à l'ischémie", les maladies vasculaires choisies parmi le groupe constitué par
20 l'infarctus du myocarde, l'ischémie cérébrale, l'insuffisance veineuse chronique, les athériopathies, c'est-à-dire des lésions dues à l'athérosclérose affectant les artères des patients, le phénomène de Raynaud lié à des vasospasmes conduisant à une vasoconstriction des artères,
25 les ulcères, l'altération de la perméabilité capillaire, la fragilité des capillaires, les cicatrisations, les altérations de la peau, les défauts rétinien d'origine ischémique, la baisse d'acuité auditive d'origine ischémique, les troubles associés aux séjours en haute
30 altitude, l'angine de poitrine engendrée par de courts moments d'obstruction coronarienne, l'hypertension pulmonaire, l'ischémie hépatique, la maladie de Parkinson,

les myopathies et les syndromes associés à des problèmes vasculaires tels que le diabète, où une hypertension et une altération du flux sanguin apparaissent dans les membres inférieurs. Ces maladies et pathologies liées à l'ischémie
5 sont bien connues des cliniciens et médecins, qui peuvent adapter l'utilisation de la composition pharmaceutique pour le traitement et/ou la prévention des symptômes et dysfonctionnements du corps humain ou animal associés aux maladies susmentionnées et/ou pour prévenir ou diminuer la
10 possibilité d'en être atteint.

Un autre aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique selon l'invention dans le cas de diminution de la production d'énergie par les cellules diverses et
15 différenciées, associée au vieillissement. C'est le cas de défauts intellectuels d'un sujet âgé, du syndrome vertigineux et de la baisse d'adaptation perspective due à une modification de la régulation du métabolisme.

Un dernier aspect de la présente invention
20 concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique selon l'invention dans le domaine des transplantations.

Ladite composition pharmaceutique peut être utilisée directement sur le patient ou destinée à un traitement ex vivo du malade, dans lequel un organe, un
25 tissu et/ou un liquide physiologique tel que le sang ou le sérum, provenant du patient lui-même ou d'un autre patient humain ou animal, est traité par l'adjonction de ladite composition pharmaceutique selon l'invention directement à l'organe, au tissu ou au liquide physiologique
30 préalablement à son administration au patient. Cette application concerne en particulier le domaine des transplantations cardiaques.

La présente invention concerne également un procédé de traitement thérapeutique et/ou prophylactique de l'ischémie et/ou des pathologies associées à l'ischémie ou à un déficit énergétique ainsi que les déficiences liées au vieillissement, comme les défauts intellectuels du sujet âgé, le syndrome vertigineux ou la baisse d'adaptation en perspective due à une modification des régulations du métabolisme, d'un patient, dans laquelle on administre audit patient la composition pharmaceutique selon l'invention de manière à traiter, soulager, dissiper ou atténuer les symptômes ou dysfonctionnements du corps humain ou animal associés aux maladies susmentionnées et/ou pour prévenir ou diminuer la possibilité d'en être atteint. Cette administration s'effectue selon les modes bien connus de l'homme de l'art, en particulier ceux appliqués pour le traitement des maladies variqueuses.

Ces effets prophylactiques et/ou thérapeutiques sont notamment décrits dans les exemples joints en annexe, en référence aux figures, donnés à titre d'illustration non limitative de l'objet de l'invention.

Brève description des figures

La figure 1 représente de manière schématique la cascade d'activation de la cellule endothéliale par l'hypoxie ainsi que ses conséquences au niveau de l'adhérence et de l'activation des neutrophiles.

La figure 2 représente de manière schématique la cascade d'activation des cellules endothéliales par l'hypoxie et ses conséquences au niveau de la paroi vasculaire.

La figure 3 représente la mesure de l'activité respiratoire des mitochondries en fonction de l'addition de différents composés actifs.

La figure 4 représente de manière schématique la chaîne des transporteurs d'électrons au niveau de la membrane mitochondriale interne.

Exemples

Les cellules endothéliales (CE), de par leur localisation à l'interface sang-tissu, sont responsables du maintien de l'homéostasie vasculaire. Elles remplissent ainsi toute une série de fonctions et interagissent constamment avec les leucocytes circulants et les cellules musculaires lisses (CML) de la média. Toute perturbation de leur métabolisme peut donc entraîner des altérations du fonctionnement des tissus sous-jacents.

Parce qu'elles sont localisées à l'interface sang-tissu, les CE sont les premières à souffrir de toute modification du flux sanguin et notamment d'une diminution de celui-ci lors des stases, qui conduisent à un appauvrissement de l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus (Hinshaw et al., 1988; Tsao et al., 1990).

L'hypoxie, qui peut notamment résulter d'une telle stase, induit une activation importante des CE qui libèrent des médiateurs de l'inflammation capables d'activer les neutrophiles et d'en induire l'infiltration ainsi que des facteurs de croissance pour les CML. Cette cascade d'événements conduit finalement à des modifications structurelles et fonctionnelles de la paroi veineuse.

Effet de l'hypoxie sur les fonctions endothéliales

Afin d'étudier les modifications du métabolisme des CE lorsque l'approvisionnement en oxygène est réduit, on incube *in vitro* des CE isolées à partir de la veine ombilicale humaine sous hypoxie. Dans ces conditions expérimentales, on n'observe pas de mortalité des CE pendant les deux premières heures d'incubation. Par contre, d'importantes modifications de leur métabolisme sont observées : les CE sont fortement activées par l'hypoxie de manière similaire à l'activation initiée par la thrombine ou l'histamine.

Le premier signe de cette activation est une augmentation de la concentration cytosolique en calcium [Arnould et al., 1992]. Cette augmentation est liée à une diminution de la concentration en ATP. Le calcium est un messager secondaire important dans toutes les cellules. Dans les CE, il est notamment capable d'activer la phospholipase A₂, première enzyme d'une voie métabolique conduisant à la synthèse de médiateurs de l'inflammation. Cette activation conduit à une synthèse accrue de prostaglandines [Michiels et al., 1993]. Elle induit également la synthèse des facteurs activateurs des plaquettes (Platelet Activating Factor (PAF)), qui est un médiateur inflammatoire très puissant [Arnould et al., 1993].

L'hypoxie entraîne donc une activation importante des CE qui libèrent alors des prostaglandines et synthétisent du PAF en grande quantité. Cette voie d'activation est résumée à la figure 1. Cette synthèse de médiateurs inflammatoires peut avoir des conséquences importantes sur l'homéostasie vasculaire en modulant les

fonctions des différents types cellulaires avec lesquels les CE sont en contact.

Afin de visualiser plus en détail quelles pourraient être ces conséquences, on étudie l'adhérence d'un type de leucocytes particuliers, les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN). *In vitro*, lorsque des CE sont soumises à une hypoxie, leur adhésivité pour les PMN augmente fortement. Cette adhérence est en partie due à la synthèse de PAF par les CE activées par l'hypoxie [Arnould et al., 1993]. Non seulement les PMN deviennent adhérents aux CE hypoxiques, mais cette adhérence est responsable de leur activation [Arnould et al., 1994] (figure 1).

Il est également connu que les CE synthétisent des molécules vasoactives qui modulent les fonctions des CML. Les expériences suggèrent que les CE activées par un manque d'oxygène libèrent différents facteurs mitogéniques pour les CML (prostaglandine F_{2a} et basic fibroblast growth factor), ce qui induit la prolifération de ces cellules [Michiels et al., 1994].

Origine présumée de la maladie veineuse

Au vu des résultats décrits en utilisant le modèle expérimental où des CE sont exposées *in vitro* à une hypoxie, l'origine des pathologies susmentionnées semble basée sur une cascade d'événements initiée par cette hypoxie et qui conduit finalement aux modifications structurelles et fonctionnelles observées dans les systèmes vasculaires.

La figure 2 illustre cette hypothèse. La stase veineuse puisqu'elle perturbe la circulation sanguine engendre une diminution de l'apport en oxygène et donc une

hypoxie. Cette hypoxie peut activer les CE qui forment la première couche de la paroi veineuse. Ces cellules libèrent alors différentes molécules inflammatoires et mitogéniques. Les molécules inflammatoires sont capables d'induire
5 l'adhérence de certains leucocytes. Cela est vrai non seulement pour les CE en culture mais également pour l'endothélium d'une veine humaine complète que ce soit une veine ombilicale [Arnould et al., 1995] ou une veine saphène. De plus, lors du processus d'adhérence, les
10 neutrophiles sont activés et peuvent relarguer protéases et radicaux libres. Ces molécules sont connues pour avoir la capacité de dégrader de nombreuses molécules biologiques dont les composants de la matrice extracellulaire comme le collagène.

15 D'autre part, les CE activées par l'hypoxie synthétisent aussi des facteurs mitogènes pour les CML qui en induisent la prolifération. De plus, on sait que les CML qui prolifèrent sont dans un phénotype synthétique au contraire du phénotype contractile normalement présent dans
20 la paroi de veines normales. Lorsqu'elles sont synthétiques, les CML synthétisent plus de composants de la matrice extracellulaire et perdent l'expression des filaments contractiles. Prolifération et synthèse accrue des composants de la matrice extracellulaire conduisent à
25 l'épaississement de la paroi veineuse alors que la perte des filaments d'actine rend compte de la perte de la contractilité globale de la veine.

A partir des résultats expérimentaux obtenus sur le modèle des CE exposées à une hypoxie, une nouvelle
30 hypothèse concernant l'origine des pathologies susmentionnées est proposée : ce serait une cascade d'interactions cellulaires faisant intervenir leucocytes et

SML et initiée par l'activation des CE par la stase veineuse qui conduirait finalement aux modifications structurelles et fonctionnelles observées.

5 Mécanisme biochimique d'action des composés actifs

Avec les composés de l'invention, on observe par exemple une inhibition de la diminution du contenu en ATP, de l'activation de la phospholipase A₂ et de l'adhérence des PMN induites par l'hypoxie. Ils sont aussi
10 capables d'inhiber l'adhérence des PMN à l'endothélium d'une veine ombilicale humaine complète lorsque celle-ci est incubée dans des conditions hypoxiques. Ces résultats indiquent clairement une action protectrice importante de ces composés sur l'endothélium soumis à une hypoxie.

15 L'inhibition par ces médicaments de la cascade d'activation des CE induite par l'hypoxie est due à leur effet inhibiteur de la chute du contenu en ATP. Cette diminution est l'événement initiateur de l'activation des CE car il est directement couplé à une entrée d'ions
20 calcium dans la cellule.

Ces composés peuvent maintenir le contenu en ATP des CE sous hypoxie selon deux hypothèses envisageables : soit les composés activent la glycolyse, soit ils préservent l'activité respiratoire mitochondriale.
25 Les Inventeurs ont découvert que ces composés n'activent pas la glycolyse dans les CE soumises à une hypoxie mais plutôt qu'ils retarderaient l'activation de la glycolyse directement induite par l'hypoxie. Ces résultats suggèrent qu'ils pouvaient agir au niveau de la mitochondrie en
30 maintenant plus longtemps une activité respiratoire sous hypoxie. Cette hypothèse est confirmée en mesurant l'activité respiratoire exprimée par le contrôle

respiratoire (RCR) (figure 3) de mitochondries de foie de rats traités *per os*.

Effet du bilobalide sur les mitochondries du cerveau dans des conditions normales

Différentes concentrations de composés actifs de l'invention (bilobalide) ont été testées sur le RCR des mitochondries isolées à partir du cerveau de rats. Cinq concentrations ont été utilisées : 4, 6, 8, 10 et 12 mg/kg de patient (rat) traité. Les rats ont reçu ces doses de bilobalide *per os* pendant 14 jours. Les mitochondries ont été isolées suivant la méthode décrite par Nowicki et al. (J. Cerebral Blood Flow and Métabolism, 2, pp. 33-40 (1982)). La respiration mitochondriale est mesurée dans une électrode à oxygène de Clark reliée à un enregistreur. Le RCR représente le contrôle respiratoire. Il représente le rapport entre la consommation en oxygène en présence de substrats endogènes (glutamate/malate) et la consommation après phosphorylation de l'ADP en ATP. Cette technique a été développée par Chance et Williams (Nature, 175, pp. 1120-1121 (1955)). On obtient en effet dose-dépendant avec une augmentation du RCR de 3,7 pour les contrôles à un RCR de 4,6 pour des concentrations de 8 et 10 mg/kg. On obtient un maximum de 24% d'augmentation à 10 mg/kg. Ces résultats montrent bien une protection de ce produit sur la respiration mitochondriale.

Effet du bilobalide sur les mitochondries du cerveau en situation d'ischémie

Une ischémie de 15 minutes a été réalisée sur des rats contrôles et des rats traités avec des composés actifs de l'invention (bilobalides) pendant 14 jours.

L'ischémie est réalisée par décapitation. Les rats ont été traités per os avec des doses de bilobalide de 10 mg/kg pendant 14 jours. Lorsque le RCR est mesuré en présence de glutamate/malate pour une ischémie de 15 minutes, on observe un RCR de 3 pour les contrôles pour un RCR de 3,9 pour les rats traités. Le composé actif possède donc une action de protection sur la diminution de l'activité respiratoire induite par l'ischémie. Cette protection se manifeste au niveau de l'activité du complexe I et de la chaîne de transport des mitochondries. Le taux de contrôle respiratoire mesuré en présence de glutamate/malate reflète indirectement l'activité du complexe I de la chaîne de transfert d'électrons.

La mesure sur le complexe I des mitochondries a été réalisée par une sonication préalable des mitochondries afin de permettre l'accès des substrats de dosage au complexe I. Celui-ci est dosé suivant la réduction du ferricytochrome C à 550 nm. La suspension de mitochondries se trouvant dans un tampon phosphate de K à 25 nM, pH 7,4, contenant du $MgCl_2$, 10 μM de cytochrome C et 2,5 mg/ml d'albumine bovine est soniquée 30 secondes à 0 °C. On ajoute 2 mM de KCW et la réaction est démarrée par ajout de 7,5 mM NADH. Les mitochondries sont incubées à 37 °C et l'on suit la réduction du ferricyanure à 550 nm. Une correction est apportée pour la réduction du cytochrome C en présence de Rotenone qui inhibe le complexe I. Les résultats sont exprimé en $\mu mole$ de ferricytochrome C réduit par minute.

L'activité du complexe I a été mesurée sur des mitochondries de rats traités 14 jours avec 10 mg/kg de bilobalide per os et après une ischémie de 15 minutes du

cerveau. On obtient pour les rats contrôles une activité de 36 mU/mg de protéine alors que les mitochondries de rats traités montrent une activité de 44 mU/mg de protéine. On constate donc une protection importante de l'activité du
5 complexe I des mitochondries. Une même protection du complexe I est aussi observée sur des mitochondries isolées de cerveau de rats n'ayant pas subi de période d'ischémie.

Effet du bilobalide sur les mitochondries du foie

- 10 Le composé actif de l'invention (bilobalide) à des concentrations de 8 mg/kg de patient (rat) a été administré per os à des rats pendant 14 jours. Les mitochondries du foie de ces rats ont été isolées selon la méthode décrite par Remacle (J. Cell. Biol. 79, 291, 1978).
- 15 L'activité respiratoire des mitochondries de rats traités a montré un RCR de 13,25 comparé à un RCR de 7,6 pour les rats témoins. Une ischémie de 10 minutes par perfusion a été réalisée sur les foies dans un milieu constitué de NaCl 0,137 M, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 0,8 mM, glucose 11 mM, Na₂HPO₃
20 0,34 mM, NaHCO₃ 24,4 mM, KH₂PO₄ 6,35 mM et bilobalide 8 mg/l. Le milieu est dégazé préalablement sous une atmosphère contenant 95% de N₂ et 5% de CO₂. Les mitochondries sont isolées et leur activité respiratoire déterminée.
- 25 Pour les témoins, les rats ont reçu de l'eau pendant 14 jours et les foies perfusés avec la même solution que les tests. Un RCR de 5,24 a été observé pour les mitochondries de rats traités et de 3,73 pour les rats témoins.
- 30 Ces résultats démontrent que le composé actif de l'invention (bilobalide) possède une activité anti-

ischémique qui se révèle à la fois *in vitro* (CE soumises à une hypoxie) et *in vivo* (ischémie hépatique et cérébrale sur rats traités) et que cette activité est due au moins en partie à une protection des mitochondries qui augmentent leur activité respiratoire et donc leur synthèse d'ATP.

Chacun des composés actifs de l'invention comme le bilobalide peut augmenter le RCR de mitochondries isolées à partir de foie de rats non traités lorsque celles-ci sont préincubées 1 heure en présence de ces médicaments. Ils peuvent donc agir directement sur les mitochondries. Il est très intéressant de noter qu'à partir de ces résultats, on peut séparer les médicaments en deux classes différentes : l'extrait de mélilot, l'extrait de *Ruscus*, les oligomères procyanoliques et les hydroxyéthylrutosides qui augmentent le RCR en augmentant le stade 3 de la respiration (classe II) alors que le bilobalide, l'aescine, la naftoquinone et la diosmine qui constituent les médicaments de la classe I augmentent le RCR en diminuant le stade 4 de la respiration (voir tableau 3).

Tableau 3 : Effet des médicaments sur la protection des mitochondries

Molécules de classe I	Concentrations finales	Effet prot. du RCR (%)	Augmentation du stade 3 (%)
Ginkor Fort	0,3 mg/ml	+ 28,1	- 21
Bilobalide	0,8 µg/ml	+ 22,7	- 41
Réparil	75 ng/ml	+ 18,1	- 43
Naftoquinone	10 ⁻⁷ M	+ 19,7	- 44
Praxilène	10 ⁻⁷ M	+ 17,7	- 35

Molécules de classe II	Concentrations finales	Effet prot. du RCR (%)	Diminution du stade 4 (%)
Vénoruton	0,1 mg/ml	+ 23,3	+ 41
Cyclo 3	4,5 µg/ml	+ 14,5	+ 20
Endothélon	1,5 µg/ml	+ 15,3	+ 82
Esbériven	1 mg/ml	+ 15,5	+ 12

Différents sites d'action semblent donc être impliqués et conduisent à augmenter l'activité respiratoire mitochondriale et ainsi à diminuer le contenu en ATP pendant l'hypoxie.

Le processus de la phosphorylation oxydative de l'ATP est un processus complexe faisant intervenir différents complexes enzymatiques ou transporteurs d'électrons générant un gradient de protons (complexes I, III, IV), l'ATP synthase (complexe V) directement responsable de la synthèse d'ATP et l'adénine translocase qui est le transporteur nécessaire à l'importation d'ADP et à l'exportation de l'ATP (figure 4). Afin de mettre en évidence quelle pourrait être la cible enzymatique de ces médicaments, chaque complexe a été inhibé par un inhibiteur spécifique et on a étudié si ces préparations pouvaient relever cette inhibition tout en mesurant le RCR. Les résultats montrent qu'aucun de ces médicaments n'a d'effet sur les complexes IV et V. Par contre, les médicaments de la classe I qui augmentent le RCR en diminuant le stade 4 protègent fortement le complexe III et dans une moindre mesure le complexe I (voir tableau 4).

Tableau 4 : Effet protecteur des médicaments de la classe
I sur les complexes I et III des
mitochondries

Molécules	Concentrations finales	Protection du complexe I (%)	Protection du complexe III (%)
Ginkor Fort	0,3 mg/ml	37,7	38,1
Bilobalide	0,8 µg/ml	27,5	47,9
Réparil	75 ng/ml	19,6	33,2
Naftoquinone	10 ⁻⁷ M	14,1	46,6
Praxilène	10 ⁻⁷ M	33,5	43,6

0,5 mM Amytal 0,75 μ M
Antimycine A

5

Le complexe I des mitochondries a été inhibé à 58% par la présence d'Amytal à 0,5 mM. Dans ces conditions, la présence des molécules aux concentrations indiquées (incubation 60 minutes) montre une inhibition nettement moins prononcée qui a été exprimée en pourcentage de protection par rapport aux mitochondries sans médicament, considérées comme ayant 0% de protection.

Par ailleurs, en mesurant directement l'activité de l'adénine translocase, on a montré que les médicaments de la classe II qui augmentent le stade 3 de la respiration augmentent l'activité de ce transporteur (voir tableau 5).

Tableau 5 : Effet des médicaments de la classe II sur l'activité de l'adénine translocase des mitochondries

Molécules	Concentrations finales	Augmentation de l'adénine translocase
Endothélon	3 μ g/ml	102,4 \pm 5,2
Venoruton	0,1 mg/ml	110,4 \pm 15

5 L'effet des médicaments a été réalisé sur l'activité de l'adénine translocase des mitochondries mesurée par le transport d'ADP (C^{14}) dans la mitochondrie pendant 45 secondes.

Par ailleurs, l'action protectrice du cyclo 3
10 sur le RCR des mitochondries est liée à l'augmentation du RCR des mitochondries mais provient sans doute de son effet protecteur sur le découplage des mitochondries. En effet en présence de cyclo 3, on observe une meilleure résistance des mitochondries au découplage par le mCCP à 0,5 et 1 μ M
15 cet effet protecteur de l'ordre de 20 %.

Une autre propriété intéressante des composés de l'invention est que l'on peut obtenir un effet synergique par la combinaison de différentes molécules agissant sur différentes cibles, par exemple, une molécule
20 agissant sur les complexes I et III qui se traduit par une diminution du stade 4 de la respiration mitochondriale et une ou plusieurs molécules agissant sur l'adénine translocase qui se traduit par une augmentation du stade 3 de la respiration mitochondriale. La double protection
25 ainsi obtenue donne un résultat global avantageux et inattendu, puisqu'il dépasse la protection maximale possible avec chacun des composés.

Deux cibles enzymatiques des composés actifs ont été identifiées. L'action des composés sur ces deux cibles a comme conséquence d'augmenter la production d'ATP par les mitochondries et d'empêcher que cette production ne
5 diminue dans des conditions ischémiques. Ainsi, ils protègent les cellules des conséquences d'un déficit énergétique qui pour les CE peut conduire à leur activation, au recrutement, à l'adhérence et à l'activation de leucocytes et à la prolifération de CML (figure 2).

10 Ces molécules ont toutes comme propriété de maintenir le taux de production de l'ATP des mitochondries élevé même dans des situations non physiologiques comme les périodes d'ischémie ou de diminution de ces activités mitochondriales dues à l'âge ou à des pathologies associées
15 au vieillissement, permettant leur application dans ces différentes pathologies.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique adéquat et un composé actif choisi parmi le groupe
- 5 constitué par les citroflavonoïdes, l'ail-rutoside, la troxérutine, la coumarine, la diosmine, les o-(-hydroxyéthyl) rutosides, les extraits de Mélilot et de rutoside, le tribénoside, l'hespéridine méthylchalcone, l'extrait de marron d'Inde, le naftazone, l'esculoside,
- 10 l'aescine, les oligomères procyanidoliques, les extraits de ruscus et d'hespéridine méthylchalcone, les ruscosides, les extraits de petit houx et cassis, les extraits d'anthocyanodisiques de myrtilles, les principes actifs de ces composés et/ou un mélange d'entre eux, agissant sur les
- 15 complexes protéiniques de la membrane mitochondriale interne d'un patient, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention de l'ischémie et/ou des pathologies associées à l'ischémie ou à un déficit énergétique.
- 20 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les pathologies associées à l'ischémie sont choisies parmi le groupe constitué par l'infarctus du myocarde, l'ischémie cérébrale, l'insuffisance veineuse chronique, les athériopathies,
- 25 c'est-à-dire des lésions dues à l'athérosclérose affectant les artères des patients, le phénomène de Raynaud lié à des vasospasmes conduisant à une vasoconstriction des artères, les déficits rétinien d'origine ischémique, la baisse d'acuité auditive d'origine ischémique, les troubles dus à
- 30 un séjour en haute altitude, les ulcères, l'altération de la perméabilité capillaire, la fragilité capillaire, les cicatrisations, les altérations de la peau, l'angine de

poitrine engendrée par de courts moments d'obstruction coronarienne, l'hypertension pulmonaire, l'ischémie hépatique, la maladie de Parkinson, le diabète et/ou les transplantations cardiaques.

5 3. Procédé de traitement ex vivo d'un patient, de préférence un patient humain, dans lequel un organe, un tissu et/ou un liquide physiologique provenant dudit patient ou d'un autre patient humain ou animal est traité par l'adjonction, à l'organe et/ou au tissu
10 préalablement à son implantation sur le patient, d'une composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique adéquat et un composé actif choisi parmi le groupe constitué par les citroflavonoïdes, l'ail-rutoside, la troxérutine, la coumarine, la diosmine, les o-(-
15 hydroxyéthyl) rutosides, les extraits de Mélilot et de rutoside, le tribénoside, l'hespéridine méthylchalcone, l'extrait de marron d'Inde, le naftazone, l'esculoside, l'aescine, les oligomères procyanidoliques, les extraits de ruscus et d'hespéridine méthylchalcone, les ruscosides, les
20 extraits de petit houx et cassis, les extraits d'anthocyanodisiques de myrtilles, les principes actifs de ces composés et/ou un mélange d'entre eux agissant sur les complexes protéiniques de la membrane mitochondriale interne d'un patient.

25 4. Procédé de traitement thérapeutique et/ou prophylactique de l'ischémie et/ou des pathologies associées à l'ischémie ou à un déficit énergétique d'un patient, de préférence un patient humain, caractérisé en ce que l'on administre audit patient une composition
30 pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique adéquat et un composé actif choisi parmi le groupe constitué par les citroflavonoïdes, l'ail-rutoside, la

troxérutine, la coumarine, la diosmine, les o-(-hydroxyéthyl) rutosides, les extraits de Mélilot et de rutoside, le tribénoside, l'hespéridine méthylchalcone, l'extrait de marron d'Inde, le naftazone, l'esculoside, 5 l'aescine, les oligomères procyanidoliques, les extraits de ruscus et d'hespéridine méthylchalcone, les ruscosides, les extraits de petit houx et cassis, les extraits d'anthocyanodisiques de myrtilles, les principes actifs de ces composés et/ou un mélange d'entre eux, agissant sur les 10 complexes protéiniques de la membrane mitochondriale interne d'un patient, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention de l'ischémie et/ou des pathologies associées à l'ischémie ou à un déficit énergétique.

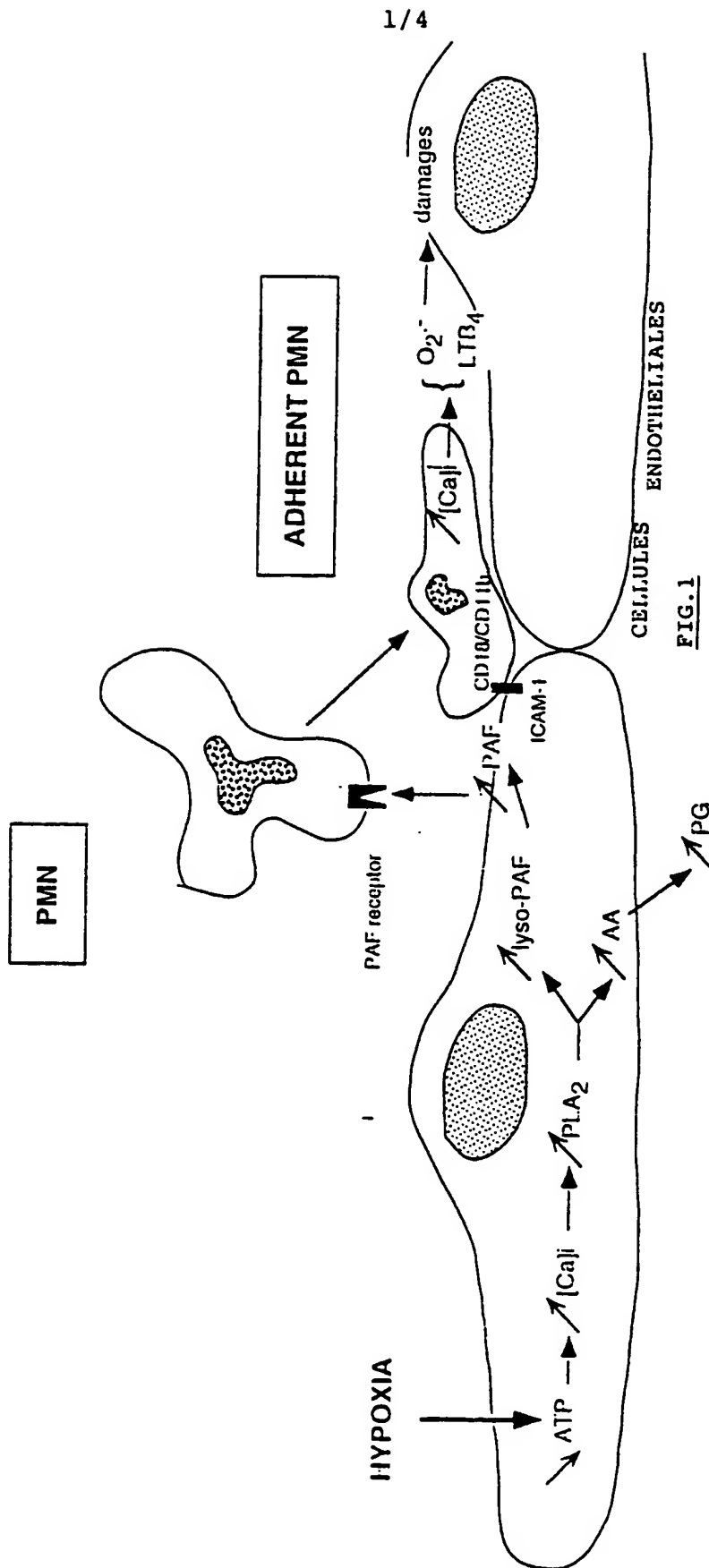
15 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que les pathologies associées à l'ischémie sont choisies parmi le groupe constitué par l'infarctus du myocarde, l'ischémie cérébrale, l'insuffisance veineuse chronique, les athériopathies, c'est-à-dire des lésions 20 dues à l'athérosclérose affectant les artères des patients, le phénomène de Raynaud lié à des vasospasmes conduisant à une vasoconstriction des artères, les déficits rétinien d'origine ischémique, la baisse d'acuité auditive d'origine ischémique, les troubles dus à un séjour en haute altitude, 25 les ulcères, l'altération de la perméabilité capillaire, la fragilité capillaire, les cicatrisations, les altérations de la peau, l'angine de poitrine engendrée par de courts moments d'obstruction coronarienne, l'hypertension pulmonaire, l'ischémie hépatique, la maladie de Parkinson, 30 le diabète et/ou les transplantations cardiaques.

6. Utilisation d'une composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique

adéquat et un composé actif choisi parmi le groupe constitué par les citroflavonoïdes, l'ail-rutoside, la troxérutine, la coumarine, la diosmine, les o-(-hydroxyéthyl) rutosides, les extraits de Mélilot et de
5 rutoside, le tribénoside, l'hespéridine méthylchalcone, l'extrait de marron d'Inde, le naftazone, l'esculoside, l'aescine, les oligomères procyanidoliques, les extraits de ruscus et d'hespéridine méthylchalcone, les ruscosides, les extraits de petit houx et cassis, les extraits
10 d'anthocyanodisiques de myrtilles, les principes actifs de ces composés et/ou un mélange d'entre eux, agissant sur les complexes protéiniques de la membrane mitochondriale interne d'un patient, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention de l'ischémie
15 et/ou des pathologies associées à l'ischémie ou à un déficit énergétique, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention des déficiences liées au vieillissement comme les défauts intellectuels du sujet âgé, le syndrome vertigineux ou la baisse
20 d'adaptation perspective due à une modification de régulation des métabolismes.

7. Procédé de traitement thérapeutique et/ou prophylactique des déficiences liées au vieillissement d'un patient, en particulier d'un patient humain, tel que les
25 défauts intellectuels du sujet âgé, le syndrome vertigineux ou la baisse d'adaptation perspective due à une modification de régulation des métabolismes, caractérisé en ce que l'on administre audit patient une composition pharmaceutique comprenant un véhicule pharmaceutique
30 adéquat et un composé actif choisi parmi le groupe constitué par les citroflavonoïdes, l'ail-rutoside, la troxérutine, la coumarine, la diosmine, les o-(-

hydroxyéthyl) rutosides, les extraits de Mélilot et de rutoside, le tribénoside, l'hespéridine méthylchalcone, l'extrait de marron d'Inde, le naftazone, l'esculoside, l'aescine, les oligomères procyanidoliques, les extraits de
5 ruscus et d'hespéridine méthylchalcone, les ruscosides, les extraits de petit houx et cassis, les extraits d'anthocyanodisiques de myrtilles, les principes actifs de ces composés et/ou un mélange d'entre eux, agissant sur les complexes protéiniques de la membrane mitochondriale
10 interne d'un patient, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement et/ou à la prévention de l'ischémie et/ou des pathologies associées à l'ischémie ou à un déficit énergétique.



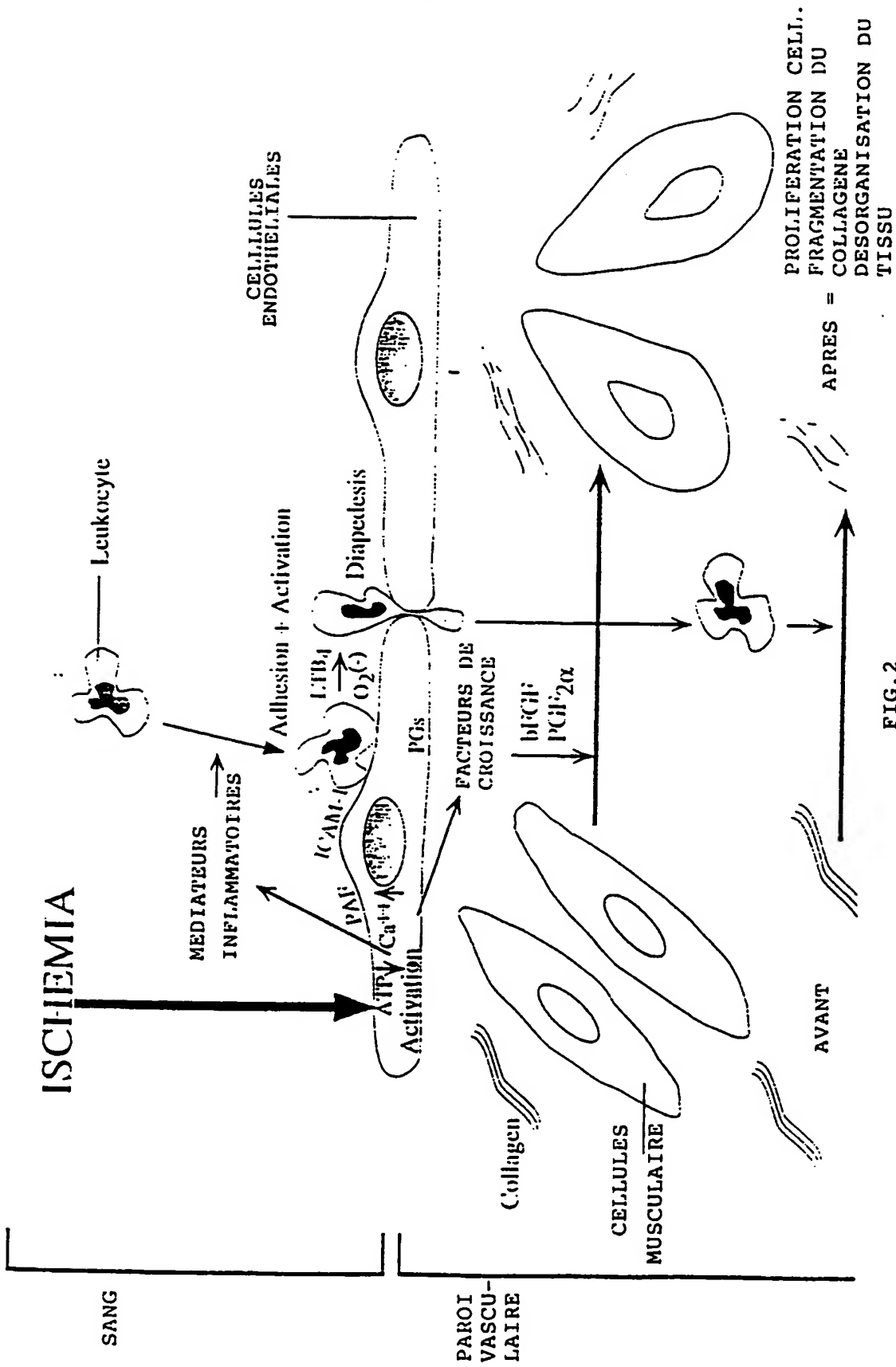


FIG.2

3/4

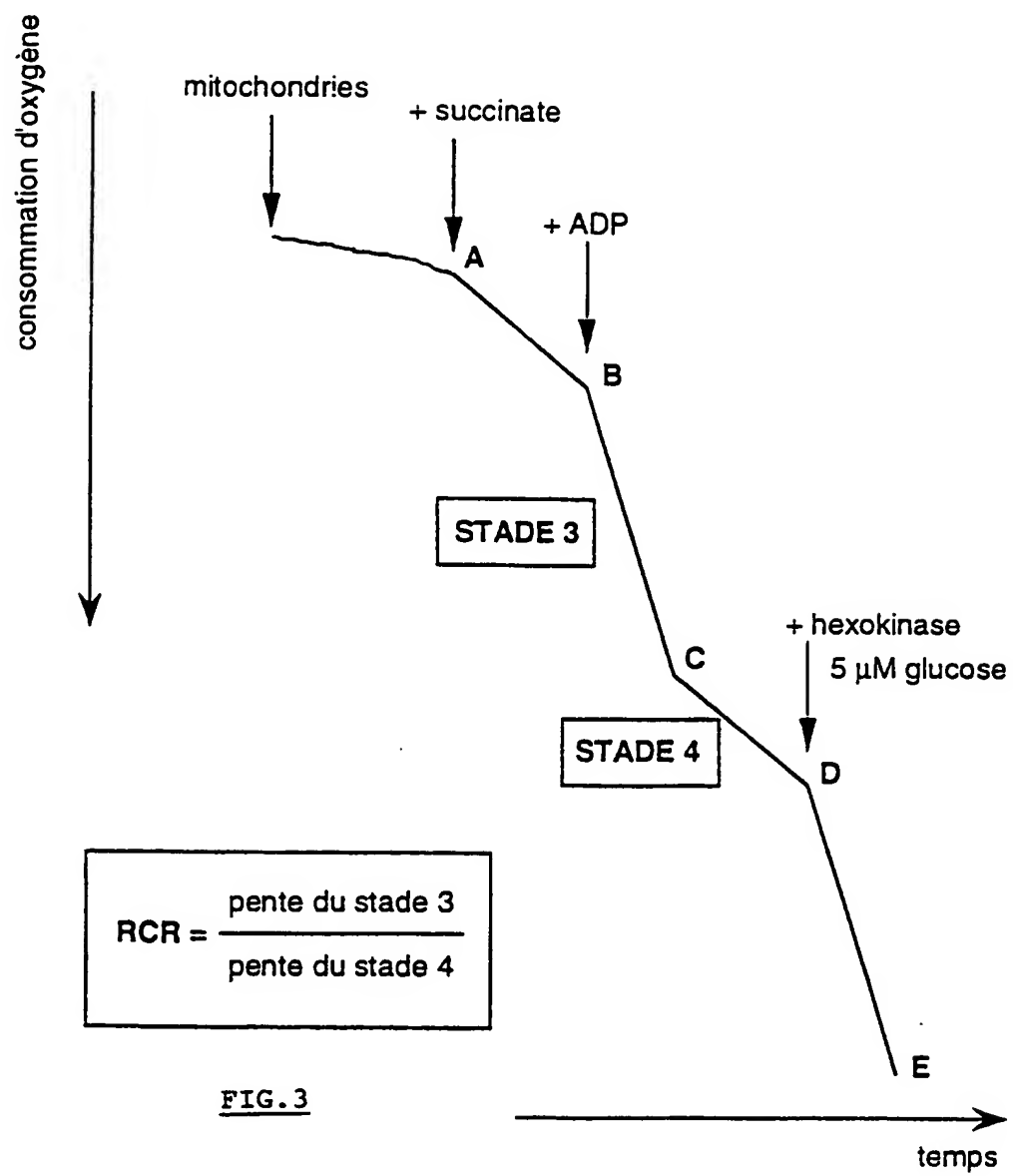


FIG. 3

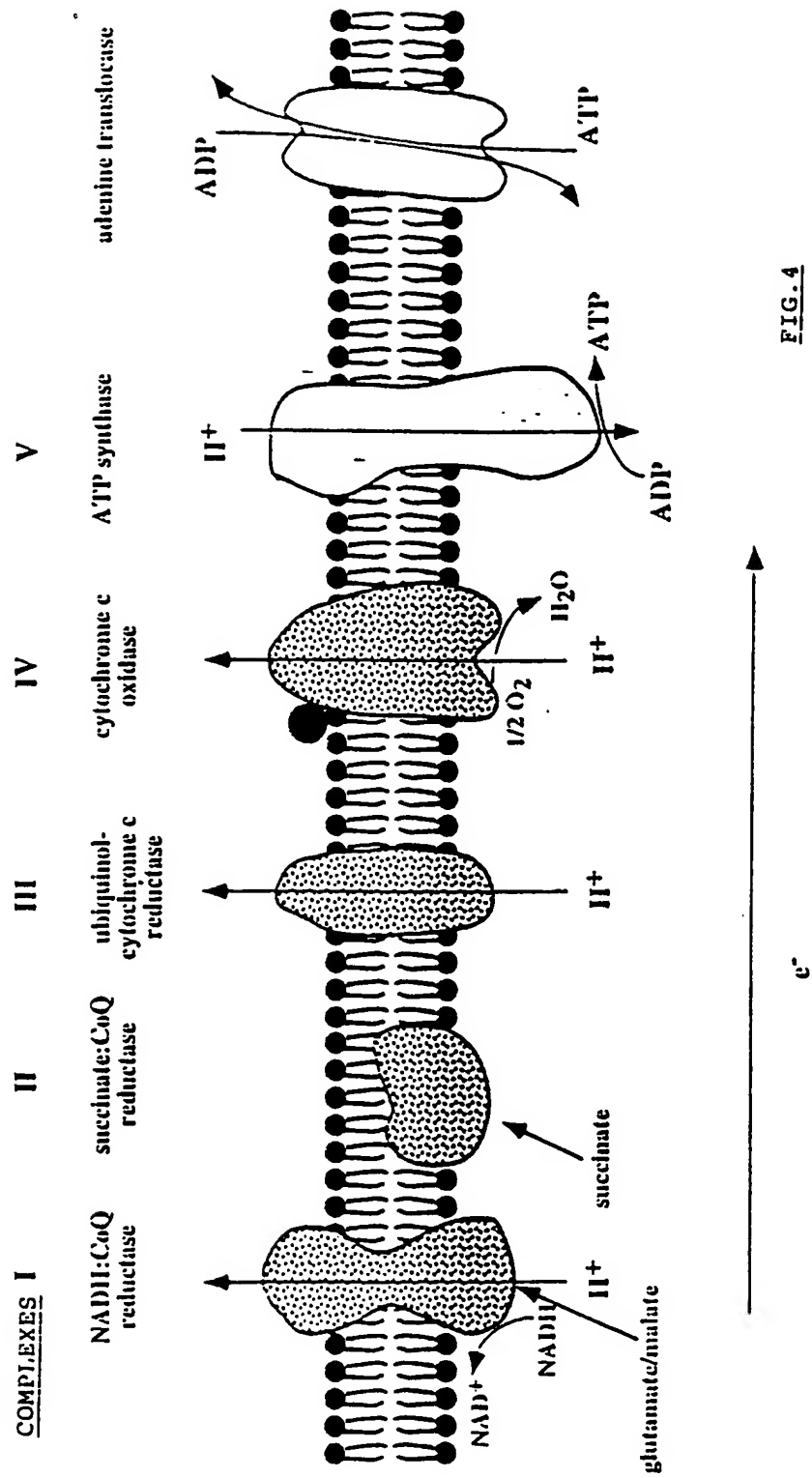


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/BE 98/00067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K31/12 A61K31/185 A61K31/37 A61K31/70 A61K35/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 631 777 A (ROUSSEL-UCLAF) 4 January 1995 see the whole document	1,2
A	D.S. REDDY ET AL.: "Anti-free radical and cardioprotective drugs in ischemic myocardial injury." DRUGS OF TODAY, vol. 31, no. 5, 1995, pages 335-349, XP002052077	
A	L. SZLAVY ET AL.: "Salvage of ischemic myocardium by CLS 2210 in the dog." ANGIOLOGY, vol. 38, no. 111, 1987, pages 85-90, XP002052078	
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 1998

Date of mailing of the international search report

03/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.